人白血病抑制因子在原核细胞中的表达与纯化

张鹤铭[1,2] 蔡楚凡[1,2] 刘杨[1,2] 甘龙站[1,2] 焦雪苗[3] 田永强[1,2*]

1 四川大学轻纺与食品学院生物质与皮革工程系 成都 610065

2 四川大学皮革化学与工程教育部重点实验室 成都 610065

3 河南大学植物逆境生物学重点实验室 开封 475001

摘要 研究证明人白血病抑制因子（hLIF）是一种对多种不同类型的细胞和组织具有重要功能的细胞因子，其独特的生物学特性使其被广泛应用。本文介绍了自制的具有生物活性的hLIF，将hLIF基因克隆到pET32a中，并利用硫氧还蛋白（Trx）作为融合配体，在大肠杆菌中成功表达可溶性融合蛋白Trx-hLIF。亲和层析纯化后利用SDS-PAGE和Western blot对纯化结果进行检验。利用肠激酶（EK酶）切割融合蛋白，释放hLIF，随后通过简单的阳离子交换得到纯度高达98.1%的hLIF 4.75mg。小鼠M1髓系白血病细胞增殖分析测定纯化的rhLIF的功能与hLIF具有相似的生物活性，EC50为5ng/mL，对应的比活性为0.5×10^7 IU/mg。

关键词 白血病抑制因子；诱导；表达；简单纯化

Soluble Expression of Human Leukemia Inhibitory Factor in Prokaryotic cells and Its Purification

ZHANG He-ming[1,2], CAI Zhi-fan[1,2], LIU Yang[1,2], GAN Long-zhan, JIAO Xue-miao[3], TIAN Yong-qiang[1,2**]

1 Department of Biomaterials and Leather Engineering, College of Textiles and Food Science, Sichuan University, Chengdu 610065

2 Key laboratory of Leather Chemistry and engineering (Sichuan University), Ministry of Education，Chengdu 610065

3 Key Laboratory of Plant Stress Biology, Henan University, Kaifeng, 475001

Abstract Numerous studies have demonstrated that leukemia inhibitory factor (LIF) is one of the most important polyfunctional cytokine, hLIF is a pleiotropic cytokine with multiple effects on different types of cells and tissues, its unique biological characteristics make it widely used .Here we presented the homemade hLIF which is biologically active, hLIF gene was cloned into pET32a, and it successfully expressed the soluble recombinant protein in E. coli using the thioredoxin (Trx) protein as a fusion partner. After purification based on membrane adsorber technology, the fusion protein was cleaved using EK protease. Released, soluble hLIF was subsequently purified by cation exchange, The samples analysis by SDS-PAGE and Western blot . This procedure yields up to 4.75 mg rhLIF with 98.1% purity. Functional analysis of the purified rhLIF by murine myeloblastic leukemia M1 cell proliferation assay demonstrates biological activity that is similar and comparable to that of hLIF, and with the EC50 of 6 ng/mL and the corresponding specific activity of 0.5×10^7 IU/mg.

Key Words leukemia inhibitory factor; induction; soluble expression; simple purification

基金项目：中央高校基本科研业务费专项资金资助（SCU2015D008），四川应用基础研究计划项目（2014JY0199）

作者简介：张鹤铭，轻工技术与工程专业在读硕士研究生，主要研究方向：生物发酵，生物制药。

*通讯作者：田永强教授，生物发酵，生物制药，微生物资源与利用。

白血病抑制因子[1]（Leukemia Inhibitory Factor，LIF）是一种多功能的细胞因子，对造血干细胞的存活、增殖及各种神经细胞的分化、成熟发挥着重要作用[2-3]，因其能抑制小鼠骨髓性白血病 M1 细胞的生长，被定性为巨噬细胞分化的诱导剂[4-5]。研究表明，LIF 还具有保持胚胎干细胞（ESC）全能性的功能[6-7]，并被广泛用于多功能干细胞的培养。然而，天然状态下 LIF 含量微少、纯化困难、价格高昂使其研究与应用受到了极大的限制。

本文主要从 hLIF 蛋白结构特性出发，构建重组质粒，优化表达条件，再经简单酶切纯化即可得到纯度高活性好的重组 hLIF，为 hLIF 后续研究提供了试验基础。

1　材料和方法

1.1 实验材料

大肠杆菌（*Escherichia coli*, *E.coli*）菌株 DH5α、BL21(DE3)、表达载体 pET32a 购自 Novagen 公司；小鼠 M1 髓系白血病细胞购自美国典型培养物保藏中心（ATCC）；常用的限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、连接酶试剂盒 Ligation mix 购自宝生物 TaKaRa 公司；琼脂糖、预染蛋白质 Marker 购自 Invitrogen 公司；*EasySee* Western Marker 购自全式金生物技术公司；2-ME、IPTG、PMSF、Trizma-base、EDTA、TEMED 等购自美国 Sigma 公司； Ampicillin、Imidazole、APS 等购自上海生工生物工程有限公司；肠激酶（EK 酶）为实验室自制；镍亲和层析柱（HisTrap FF crude）、强阳离子交换色谱柱（HiTrap SP HP column）、强阴离子交换色谱柱（HiTrap Q HP column）、硝酸纤维素膜（NC 膜）购自美国 GE 公司；胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自天根生化科技公司；鼠源抗 His-tag 单克隆抗体(monoclonal antibody，mAb)购自武汉三鹰生物技术有限公司，LumiGLO ECL 检测试剂盒购自德国罗氏公司；医用 X 光胶片购自伊士曼柯达公司；胰蛋白胨(tryptone)、酵母提取物（Yeast extract）购自英国 OXOID 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因克隆

hLIF 基因序列来源于 GenBank (NCBI Reference Sequence: NM_002309.3)，根据大肠杆菌密码子偏爱性对 hLIF 基因序列进行优化设计[8-10]，目的蛋白与硫氧还蛋白(Thioredoxin ,Trx)融合表达，以提高目的蛋白的可溶性表达[11-12] 。优化后基因序列由上海生工生物工程有限公司合成。合成序列克隆到载体 pET32a 中，得到重组质粒，并通过 DNA 测序确认。

1.2.2 *E. coli* BL21(DE3)pET32a-LIF 原核表达菌株的构建

利用 DNAstar 序列分析软件，对来自 GenBank 数据库的 hLIF cDNA 序列进行密码子优化，使其易于在大肠杆菌中表达。对优化后的 hLIF 基因序列进行合成，合成时，在 hLIF 基因前加上 EK 酶表达序列，合成基因装入 pUC57 中。利用 *Kpn* Ⅰ/ *Hind* Ⅲ对 pUC57-hLIF 双酶切，回收 hLIF 表达序列插入经 *Kpn* Ⅰ/ *Hind* Ⅲ双酶切的原核表达载体 pET32a 中，构建重组质粒 pET32a-hLIF，然后将经测序确定的重组质粒转入 BL21(DE3)中，得到 *E. coli* BL21(DE3)pET32a-LIF 原核表达菌株。

1.2.3 融合蛋白 Trx-hLIF 的诱导表达

挑取单菌落接入 LB 液体培养基(100μg/mL Amp)中，37℃过夜培养， OD_{600} 达到 0.6，加 IPTG 诱导。用 12%的 SDS-PAGE 检测融合蛋白 Trx-hLIF 的表达情况，用 Bio-Rad GelDoc XR 凝胶成像系统对电泳结果进行分析。

1.2.4 融合蛋白 Trx-hLIF 的纯化

低速（5000rpm×5min）离心收集诱导后的菌体，用破菌缓冲液（20 mmol/L Tris-HCl，0.5 mol/L NaCl，pH8.0）重悬菌体，加溶菌酶（终浓度 1mg/mL），30℃温浴后反复冻融进行破胞。低温（冰浴）超声处理后高速（12000rpm×10min）离心收集上清，0.45μm 滤膜过滤。由于重组蛋白带有 6 个组氨酸标签，用镍离子亲和层析柱对融合蛋白 Trx-hLIF 进行初步纯化， 并用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定纯化结果。再用 HiTrap Q HP column 除去咪唑，同时对融合蛋白进行进一步纯化。

1.2.5 hLIF 的释放和纯化

先用 EK 酶对纯化的融合蛋白 Trx-hLIF 做预酶切，16℃温浴 10h。根据预酶切结果选择最佳酶切条件对融合蛋白进行酶切，释放的 hLIF，由于 hLIF 的理论等电点（pI，9.28）高于融合伴侣（Trx）和重组肠激酶，因此可以通过简单的色谱分离纯化 hLIF。SDS-PAGE 分析纯化结果，Bradford 法测定 hLIF 的浓度。

1.2.6 hLIF 氨基酸组成验证

将纯化样品按 1:1 的比例加入 6M 的盐酸，于 120℃水解 12h，冷却至室温，加上样缓冲液对处理后的样品进行稀释，定容，0.22μm 的滤膜过滤即可上机。分别取 20μl 标样及试样进样,根据标样加入的保留时间定性，再根据试样峰面积与标样峰面积比较定量。

1.2.7 生物活性检测检测

用脂肪干细胞(ASCs)与小鼠 M1 髓系白血病细胞的培养对纯化后的 hLIF 进行生物活性的鉴定。

1.8.1 hLIF 对 ASCs 培养形态学的影响

用含 10ng/ml hLIF 的 DMEM 培养液与未含 hLIF 的 DMEM 培养液分别培养 ASCs 14 天，观察其细胞形态的变化情况。

1.8.3 hLIF 对小鼠 M1 髓系白血病细胞生长的影响

细胞增殖检测使用改性 MTT（3-(4，5-二甲基噻唑-2)-2，5-二苯基四氮唑溴盐）法，测定如文献[13]所述，将小鼠 M1 髓系白血病细胞维持在含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中。终浓度为 0.1pg/mL-10ng/mL 的 rhLIF 按梯度与 1×10^4 个 M1 细胞/孔在 96 孔板中孵育。37℃、5%CO_2 下孵育 72 小时，在 570nm 波长下测量吸光度，每个试验重复 5 次。计算 rhLIF 对小鼠 M1 髓系白血病细胞生长的抑制率：

抑制率=（样品的平均吸光度）/对照样品的平均吸光度）×100%。

2 结果讨论

2.1 hLIF 融合基因的克隆

将 hLIF cDNA 插入 pET32a 质粒的 Trx，His-tag 序列之后，Trx-hLIF 表达由 T7 强启动子控制（图 1A）。此种设计方案，表达的融合蛋白 Trx-hLIF 经 EK 酶切割除去 Trx 和 His-tag 后，即可得到分子量为 20kDa 的 hLIF。所得到的预测分子量为 34kDa 的融合蛋白 Trx-hLIF 如图 1B 所示。

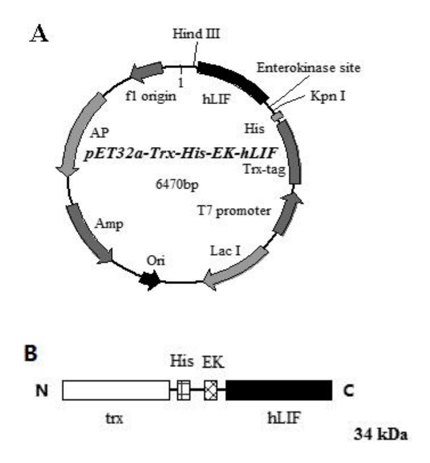


图 1：表达载体的构建。

Fig. 1. Construction of the expression vectors.

(A) Vector map of pET32b-trx-his-tevhLIF. (B) Schematic representation of the resulting fusion protein with a predicted molecular weight of 34 kDa. N, Amino terminus of the polypeptide; trx, thioredoxin; His, His-tag (6 × His); EK protease cleavage site recognized by EK protease;hLIF, human leukemia inhibitory factor; C, carboxy terminus of the polypeptide.

2.2 融合蛋白 hLIF 的诱导表达

挑取 BL21(DE3)pET32a-hLIF 单克隆菌株扩大培养，并在不同 IPTG 浓度（0.25 mmol/L、0.50 mmol/L），不同诱导温度（37℃、16℃）诱导表达。取诱导前、后菌液收集菌体、破菌上清和沉淀，用 12%SDS-PAGE 分析（图 2）。

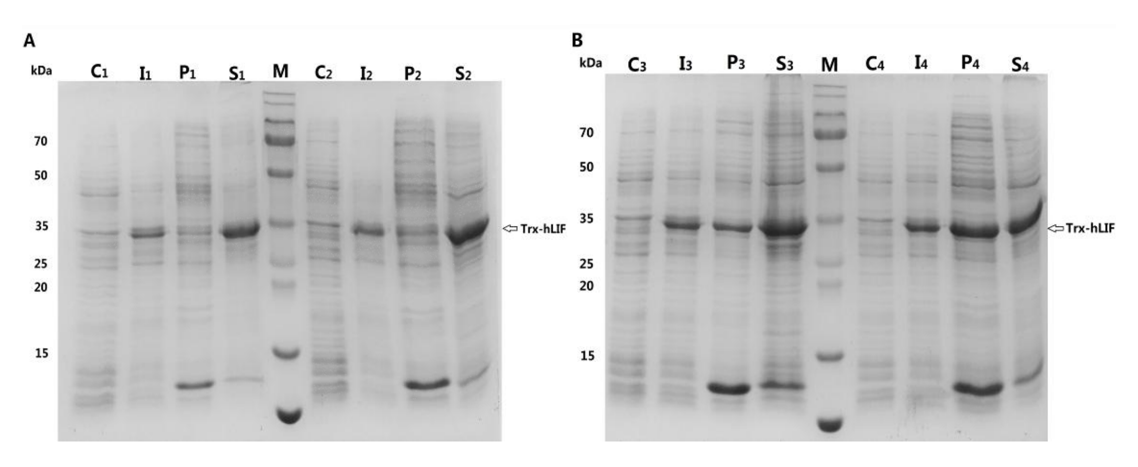


图 2.融合蛋白 Trx-hLIF 的诱导表达的 SDS-PAGE 分析。

Figure 2. SDS-PAGE analysis of fusion protein Trx-hLIF expression.

The expression of fusion protein at 37 ℃ (A), 16 ℃ (B) at different temperatures, 0.5 mmol / L (1,3) 0.25 mmol / L (2,4) at different concentrations of IPTG, and the arrows indicated that the The position of the fusion protein Trx-hLIF. Equal amounts of cells were loaded into the C and I lanes. For the P and S lanes, the volume of the precipitant obtained after sonication and centrifugation was adjusted to ensure that it was obtained from the same amount of cells. 10 μl of sample was loaded. M: molecular weight size marker; C: total cellular protein before IPTG induction (control); I: total cellular protein after IPTG induction; P: soluble supernatant after sonication; S, insoluble cell pellet. Gel electrophoresis was performed in a 12.5% SDS-PAGE, followed by staining with Coomassie brilliant blue R-250.

表 1.不同温度和 IPTG 浓度条件下融合蛋白 Trx-hLIF 的表达情况。

Table 1. Expression of fusion protein Trx-hLIF at different temperatures and IPTG concentrations.

温度	可溶性（%）		不可溶性（%）	
	0.25 mmol/LIPTG	0.5 mmol/LIPTG	0.25 mmol/LIPTG	0.5 mmol/LIPTG

16℃	34.3	28.7	30.6	35.6
37℃	16.8	9.1	53.9	55.1

融合蛋白 Trx-hLIF 在 37℃，0.5 mmol/L IPTG 诱导时，可溶性所占比例仅为 9.1%。在相同 IPTG 浓度，降低诱导温度至 16℃，融合蛋白 Trx-hLIF 所占比例为 28.7%，提高了 215.4%。与此对应的当诱导温度为 16℃，降低 IPTG 浓度至 0.25mmol/L，融合蛋白 Trx -hLIF 在可溶性蛋白中所占比例为 34.3%，提高了 19.5%。相同温度，降低 IPTG 浓度或者相同 IPTG 浓度，降低诱导温度，均能够增加融合蛋白 Trx-hLIF 在可溶性部分的表达比例，与此同时在不可溶部分所占比例则有所降低。

2.3 融合蛋白 hLIF 的纯化

4mL 预培养的菌株 BL21(DE3)pET32a-hLIF 的过夜菌接入 400mL 新鲜的 LB 培养基 (含 100μg/mL Amp)中，37℃ 培养至 OD600 为 0.6 时，加入终浓度为 0.25 mmol/L 的 IPTG，16℃ 诱导 15h，收集菌体，重悬菌体，超声破菌，离心收集上清。

选用 HisTrap FF crude，结合缓冲液：20mmol/L Tris-HCl，0.5mol/L NaCl，pH 8.0；洗脱缓冲液：分别用含不同浓度（0 mmol/L、10 mmol/L、50mmol/L、100mmol/L、250mmol/L、500mmol/L）咪唑的 20mmol/L Tris-HCl（pH8.0）洗脱。洗脱结果用 12%SDS-PAGE 分析（图 3A）。

用抗 His-tag 多克隆抗体对 HisTrap FF crude 纯化的样品做 Western blot 检测。检测到分子量为 34kDa 的 Trx-LIF 融合蛋白条带（图 3B，孔道 6、7），即大部分非特异性结合的杂蛋白流穿或被洗涤除去，部分杂蛋白被 100mmol/L 以下的咪唑所洗脱，融合蛋白 Trx-hLIF 在 250mmol/L、500mmol/L 咪唑均有被洗脱。收集洗脱的融合蛋白 Trx-hLIF 再由 HiTrap Q HP column 做进一步纯化，最终得到的 Trx-hLIF 纯度达到 94.2%（图 3C），利用 Bradford 法测定蛋白浓度，最终收集融合蛋白 Trx-hLIF 11.00mg。

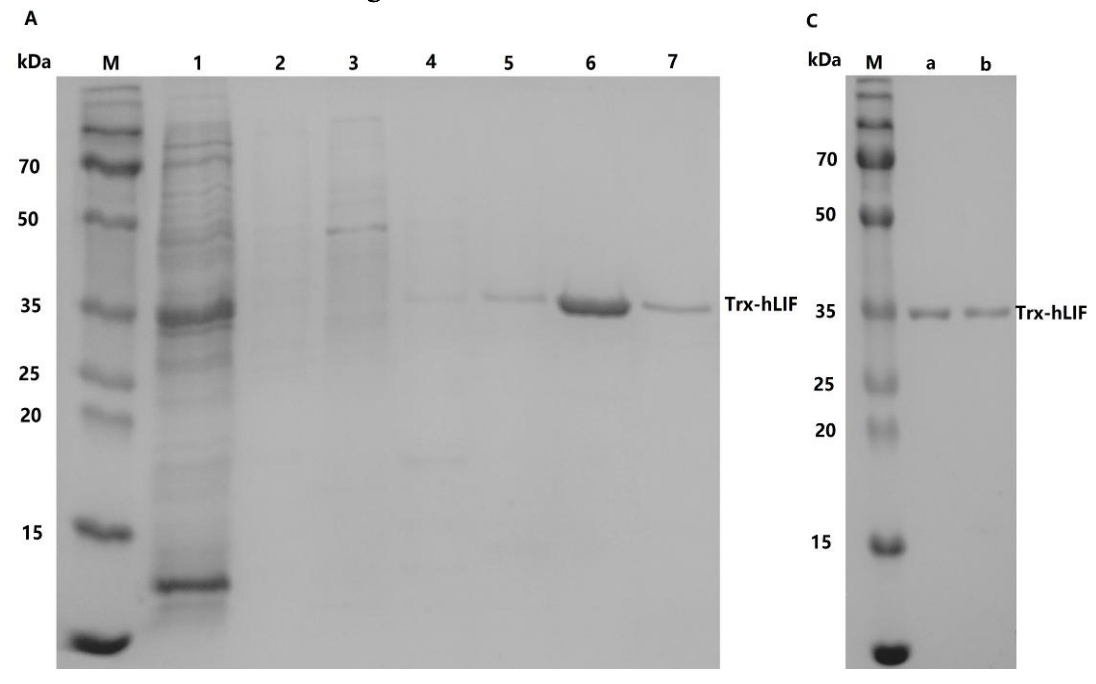




图 3.融合蛋白 Trx-hLIF 纯化结果的 SDS-PAGE 分析。

Figure 3. SDS-PAGE of The purified protein Trx-hLIF was purified.

HisTrap FF crude purified SDS-PAGE (A)and Western blot results(B); HiTrap Q HP column purification results(C）. M: standard protein molecular weight; 1: soluble supernatant after sonication; 2-7: eluted separately from 0, 10, 50, 100, 250 and 500 mmol / L imidazole; a, b: HiTrap Q HP column Purify the sample Gel electrophoresis was performed in a 12.5% SDS-PAGE, followed by staining with Coomassie brilliant blue R-250.

2.4 hLIF 的释放与纯化

利用 EK 酶对融合物蛋白 Trx-rhLIF 酶切，释放酶切位点下游 hLIF。在加入 EK 酶之后的 0，2，4，6，8，10 小时对酶切样品进行取样，并通过 12%SDS-PAGE 分析（图 4）。从酶切电泳图可知融合蛋白 Trx-rhLIF 可以在 16℃，8 小时被酶切完全，切割为融合标签 Trx 和目的蛋白 hLIF（图 5，泳道 4），并且从考马斯亮蓝 R250 染色的凝胶上观察到被释放的蛋白约 20 kDa，这与成熟 hLIF 相对分子质量一致。酶切反应完全之后，并通过 5ml HiTrap SP HP 柱分离纯化，利用 12% SDS-PAGE 分析，纯化的蛋白为约 20kDa 单一条带，纯度高达 98.1%（图 4，泳道 7）。收集得到 hLIF 4.75mg，回收率为 43.2%。

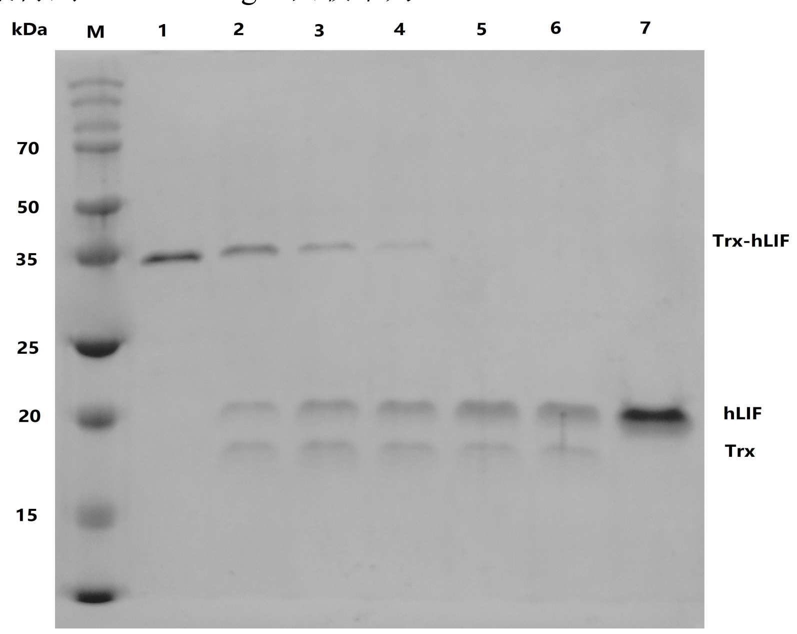


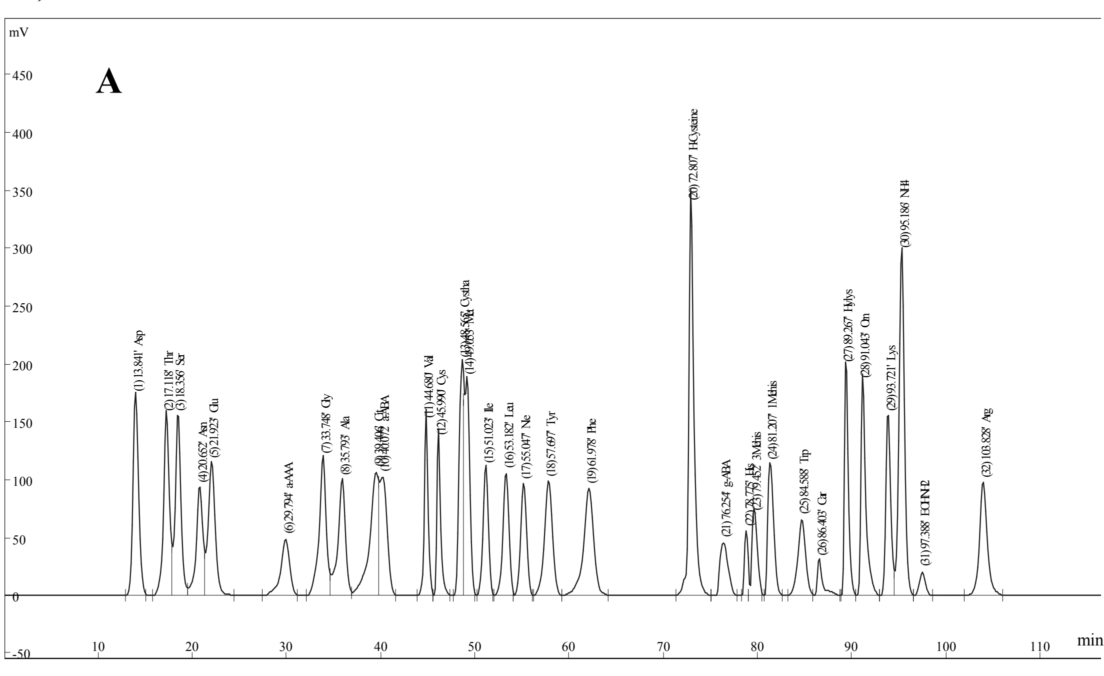
图 4.融合蛋白 Trx-hLIF 肠激酶（EK 酶）酶切的 SDS-PAGE 分析。

Figure 4. SDS-PAGE analysis of the fusion protein Trx-hLIF enterokinase (EK enzyme) digestion.

M: standard protein molecular weight; 1: purified fusion protein Trx-hLIF no EK enzyme; 2-6: plus EK enzyme 16 ℃ incubation 2, 4, 6, 8, 10 hours of digestion effect; 7: SP column purification Of the mature hLIF. Gel electrophoresis was performed in 12.5% SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.5 重组 hLIF 的氨基酸组成分析

将 hLIF 样品经浓盐酸水解，使蛋白完全变成氨基酸后用 A300 自动氨基酸分析仪（德国曼默博尔公司）进行分析。在最优色谱条件下，用 18 种氨基酸标准品进样，分析得到标准谱图，标准品中 18 种氨基酸能全部分离，且分离度较高，达到 2.0~13.3，峰型较好，如图 5A 所示。



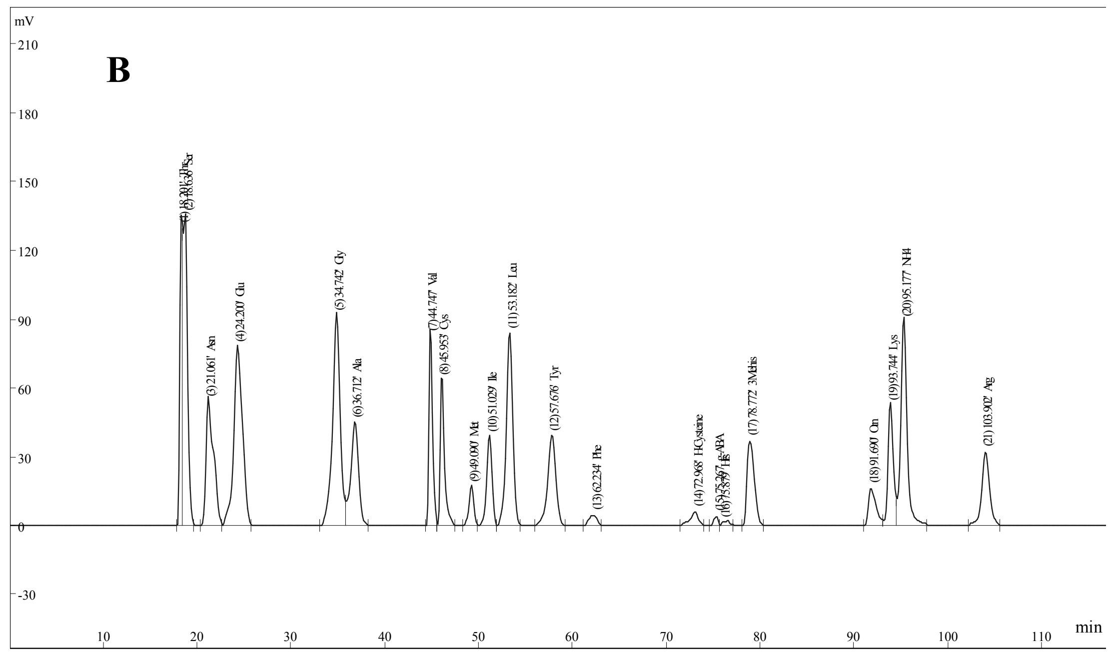


图 5.氨基酸色图谱。

Figure 5. Amino acid chromatogram.

A :. Amino acid standard chromatogram; B: mature hLIF chromatogram

表 2.纯化得到的成熟 hLIF 氨基酸分析结果。

Table 2. Purified mature hLIF amino acid analysis results.

氨基酸	理论值（E_i）	测定值（O_i）	E_i-O_i	（E_i-O_i）^{2}	（E_i-O_i）^{2}/ E_i
Thr	10	10.9065	0.758901	-0.7589	0.575931
Ser	10	13.23402	3.05492	-3.05492	9.332535
Asp	21	14.71199	-6.48711	6.487114	42.08265
Glu	12	19.12333	6.864526	-6.86453	47.12172
Gly	12	18.71717	6.463864	-6.46386	41.78153
Ala	14	10.18218	-3.95561	3.955614	15.64688
Val	11	11.85759	0.697119	-0.69712	0.485975
Cys	6	12.44878	6.280306	-6.28031	39.44224
Met	1	2.318492	1.287115	-1.28712	1.656665
Ile	10	8.075798	-2.03349	2.033494	4.135097
Leu	25	19.2023	-6.05757	6.057567	36.69412
Tyr	7	9.209659	2.085022	-2.08502	4.347318
PHe	6	0.939243	-5.07347	5.073468	25.74008
His	6	1.809665	4.214826	17.76476	2.960793
Lys	12	8.417648	3.69627	13.66241	1.138534
Arg	6	7.845641	-1.73946	3.025735	0.504289
合计	169	169	0		31.99683

注：氨基酸分析仪不能测定 Pro，Asn 和 Gln 分别变为对应的 Asp 和 Glu，Met 破坏一半。

Note: amino acid analyzer can not determine Pro, Asn and Gln, respectively, into the corresponding Asp and Glu, Met destroyed half.

hLIF 氨基酸图谱分析如图 5A 所示。测定的氨基酸组成比例（表 2）与已知的 hLIF 的各种氨基酸组成基本相似(^{2}=31.99683＜($^2_{0.005}$。

2.5 生物活性测定

脂肪干细胞（ADSCs）用含 10ng/ml rhLIF 融合蛋白培养基培养 14 天后，细胞形态如 ADSCs 原始形态，多数呈成纤维细胞样伸展的长梭形（图 6 A，B）。然而用不含 rhLIF 融合蛋白的培养基培养 14 天后，细胞形态发生了明显的变化，如 ADSCs 细胞核和核仁出现明显的分化（图 6 C）。

通过 MTT 测定，并计算抑制率。将不同浓度的 hLIF 添加到在 96 孔板上生长的鼠 M1 细胞中，72 小时孵育，测定细胞增殖情况， hLIF 对鼠 M1 细胞明显抑制作用。计算 hLIF 的半数最大效应浓度（EC 50）为 5ng / mL，对应的比活性 0.5× 10^7IU / mg。

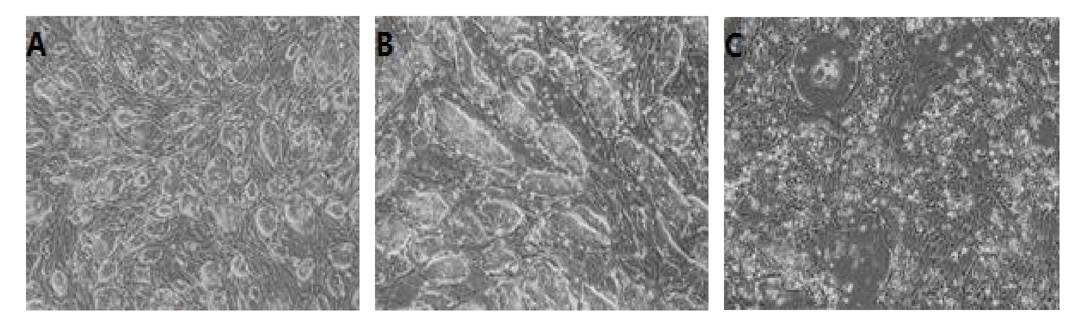


图 6：干细胞未分化标志的检测。

Figure 6: Detection of undifferentiated markers of stem cells.

ESC original form（A）; ESC morphology after culturing for 14 days with 10 ng / ml rhLIF fusion protein medium (B); ESC morphology after 14 days without rhLIF fusion egg culture (C).

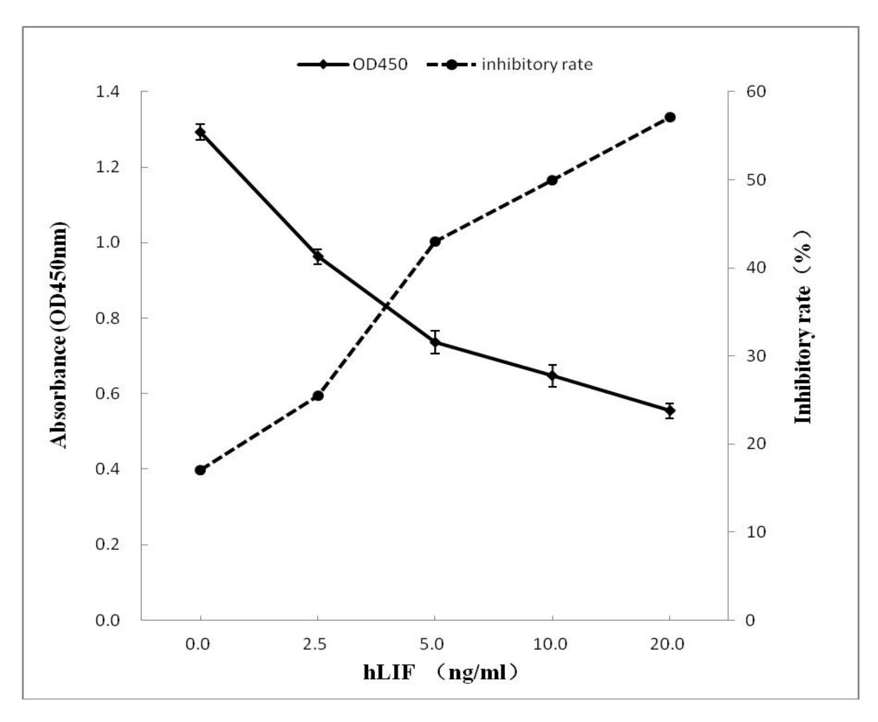


图 7：纯化的 hLIF 融合蛋白对鼠 M1 细胞增殖的抑制作用。

Figure 7. Inhibitory effects of purified hLIF on the proliferation of M1 cells.

Cell proliferation was measured by an MTT assay. The data represent themean±standard error of five repeat experiments.

3 结论

天然状态下 hLIF 含量极微，且纯化困难，使其应用与进一步研究受到了极大限制。基因重组技术以成本低、纯度高、宜于制备等特点，克服了上述不足。同时大肠杆菌为宿主的蛋白表达体系以其遗传背景清楚，繁殖快，成本低，表达量高，易于操作等优点，使之成为外源基因表达的首选菌株。

本试验成功设计并克隆融合了 His-tag、Trx 和 EK 蛋白酶特异性切割位点的重组质粒 pET32a-Trx-His-EK-hLIF，并成功在 BL21(DE3)中得到高效表达。由于大肠杆菌表达外源蛋白多因错误折叠聚集而丧失生物活性，以包涵体的形式存在于沉淀中[14]。本文通过减少 IPTG 浓度、降低诱导温度既可以诱导重组蛋白最大限度的可溶性表达[15]，又能避免过高的 IPTG 对工程菌的毒害作用[10]，16℃，0.25mmol/L IPTG 诱导，融合蛋白 Trx -hLIF 在可溶性蛋白中所占比例达到 34.3%。通过 HisTrap FF crude 梯度洗脱纯化和与 HiTrap Q HP column 进一步纯化处理，可以获得具有高纯度的融合蛋白 Trx-hLIF。随后利用 EK 酶酶切，hLIF 被成功释放，再利用简单的 HiTrap SP HP column 进行纯化，得到纯度高达 98.1%的 hLIF。氨基酸分析验证，MTT 法测定证明了其生物活性， hLIF 的纯度与回收率也超过以前的研究[16-17]。

总的来说，在此我们描述了一个简单，方便，经济的用于生产重组 hLIF 的研究方法。我们希望这将是一个很好的用于生产其他细胞因子的设计模型。

参考文献 [References]

［1］ Nishimoto N, Ogata A, Shima, Y, et al. Oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and interleukin 6 inducethe proliferation of human plasmacytoma cells via the commonsignal transducer, GP130. J Exp Med, 1994, 179(4):1343-1347.

[2] Yarnamori T, Fukada K, Aebersold R, et al. The cholinergic neuronaldiffere ntiation factor from heart cells is identical to leuke mi a inhibitory factor. Science, 1989, 246(4936):1412-1416.

[3] Patersen PH. Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface betwcen neurobidogy and immunology. Proc Nag Acad Sci USA ,1994,91(17):7833-7835.

[4] Gearing PD, Gough MN, King AJ, et al. Molecular cloning and expression of cDNA encodinga murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) . Embo Journal, 1987,6 (13):3995–4002.

[5] Gough MN, Gearing PD, King A J, et al. Molecular cloning and expression of the human homologue of themurine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor. Proc Natl Acad Sci USA, 1988,85(8):2623–2627.

[6] Gearing DP, Thut CJ, VandeBos T. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. Embo Journal. 1991, 10(10):2839-2848.

[7] Chung CD, Liao JY, Liu B, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. Science, 1997, 278(5344):1803-1805.

[8] Wang Q, Mei C, Zhen H, et al. Codon preference optimization increases prokaryotic cystatin C expression. Biomed Research International, 2012, 2012(3): 732017.

[9] Burgess-Brown NA, Sharma S, Sobott F, et al. Codon optimization can improve expression of human genes in Escherichia coli: amulti-gene study. Protein Expression & Purification, 2008,59(1) : 94-102.

[10] Kim S, Lee SB. Soluble expression of archaeal proteins in Escherichia coli by using fusion-partners. Protein Express Purif. 2008, 62(1):116–119.

[11] Turner P, Holst O, Karlsson EN. Optimized expression of soluble cyclomaltodextrinase of thermophilic origin in Escherichia coli by using a soluble fusion-tag and by tuning of inducer concentration. Protein Express Purif. 2005 ,39(1),54–60.

[12] Stevens, RC. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. Structure. 2000, 8(8): 177-185.

[13] Zhou JJ, Han JX, Yang WY. Improved MTT assay for activity of antitumor agents. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 1993, 24(10):455-457.

[14] Lian J, Ding S, Cai J ,et al. Improving aquaporin Zexpression in Escherichia coli by fusion partners and subsequent condition optimization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009, 82(3):463-470.

[15] Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. Applied Microbiol and Biotechnol. 2014, 67(12): 289–298.

[16] Samal BB, Arakawa T, Boone TC, et al. High level expression of human leukemia inhibitory factor (LIF) from a synthetic gene in Escherichia coli and the physical and biological characterization of the protein. Biochim. Biophys. Acta , 1995, 1260(1):27-34.

[17] Tomala M, Lavrentieva A, Moretti P, et al. Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant Escherichia coli using thioredoxin as fusion partner. Protein Express Purif. 2010, 73(1):51-57.